

مطالعه ارتباط سطح آنتی‌بادی‌های ضد ویروس اپشتاین بار در بیماران مبتلا به مولتیپل اسکلروز و تولید سایتوکاینهای IFN- γ ، IL-4 و IL-12 توسط سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی فعال شده با میتوژن

چکیده

زمینه و هدف: مولتیپل اسکلروز (MS) شایع‌ترین بیماری التهابی سیستم عصبی مرکزی می‌باشد که در آن طی یک روند خودایمنی، غلاف میلینی فیبرهای عصبی از بین می‌رود. در این بیماری لنفوسیت‌های CD4+ T بویژه زیر گروه TH1 در تخریب بافت عصبی نقش مهمی ایفا می‌کنند. با توجه به نقش احتمالی ویروس اپشتاین بار در اتیولوژی و پاتوژنز بیماری MS، هدف از این مطالعه بررسی ارتباط سطح آنتی‌بادیهای ضد ویروس اپشتاین بار (EBV) با تولید سایتوکاین‌های TH1 و TH2 می‌باشد.

روش بررسی: در ۶۸ بیمار مبتلا به مولتیپل اسکلروز در مراحل مختلف بیماری و ۲۰ نفر از افراد سالم بعد از گرفتن نمونه خون وریدی سطح آنتی‌بادیهای ضد EBNA-1 و VCA از ویروس EBV به روش الایزا در پلاسما اندازه‌گیری گردید. سپس سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (PBMC) به کمک فایکول جدا شد. PBMC به دست آمده پس از کشت، توسط PHA تحریک و سطح سایتوکاینهای IFN- γ ، IL-12 و IL-4 در مایع رویی کشت سلول به روش الایزا تعیین گردید. تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS (version 16) صورت گرفت. جهت مقایسه مقادیر سایتوکاینها آزمون آماری پارامتریک t-test و برای مقایسه مقادیر EBNA-1 و VCA آزمون غیرپارامتریک Mann-Whitney بکار گرفته شد. همچنین برای بررسی ارتباط بین متغیرها از ضریب همبستگی پیرسون استفاده شد. $P < 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: میانگین سطح آنتی‌بادی‌های ضد EBNA-1 و VCA در بیماران مبتلا به MS نسبت به افراد سالم افزایش معنی‌داری داشت (به ترتیب $P=0.04$ و $P=0.01$). میانگین غلظت IFN- γ ، IL-12 و IL-4 نیز در بیماران به طور معنی‌داری بیش از افراد سالم بود (به ترتیب $P=0.01$ ، $P=0.02$ و $P=0.005$). همچنین نسبت سایتوکاین‌های IFN- γ /IL-4 و IL-12/IL-4 در بیماران بیش از افراد سالم بود ولی این افزایش معنی‌دار نبود ($P>0.05$). بین سطح آنتی‌بادی‌های ضد EBNA-1 و VCA با تولید IL-12 ارتباط معنی‌داری وجود داشت (به ترتیب $P=0.02$ و $P=0.04$). در حالیکه ارتباطی میان افزایش سطح آنتی‌بادی‌های ضد اپشتاین بار و ویروس با تولید سایتوکاین‌های IFN- γ و IL-4 در بیماران مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: با توجه به ارتباط معنی‌دار بین سطح آنتی‌بادی‌های ضد ویروس اپشتاین بار با تولید IL-12 در بیماران مبتلا به MS و نقش این سایتوکاین در هدایت پاسخ‌های ایمنی به سمت التهاب و سلول‌های TH1، این یافته‌ها پیشنهاد می‌کند که ویروس اپشتاین بار می‌تواند نقش مهمی در اتیولوژی بیماری MS ایفا کند.

کلیدواژه‌ها: ۱- اپشتاین بار ویروس ۲- مولتیپل اسکلروز ۳- سایتوکاین

تاریخ دریافت: ۸۷/۷/۱۳ تاریخ پذیرش: ۸۸/۲/۲۶

مقدمه

مولتیپل اسکلروز (MS) از مهمترین بیماریهای التهابی بخوبی مشخص نشده است اما ممکن است عوامل عفونی سیستم عصبی مرکزی می‌باشد که اتیولوژی آن هنوز در ایجاد آن نقش داشته باشند.^(۱) در طی این بیماری

این مقاله خلاصه‌ای است از پایان‌نامه خانم بهاره لاریبی جهت دریافت درجه کارشناسی ارشد به راهنمایی دکتر مهدی شکرآبی و مشاوره دکتر امیر حسن زرنانی، سال ۱۳۸۷
(I) دانشیار، مرکز تحقیقات ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی ایران، تهران، ایران (* مؤلف مسؤول)
(II) کارشناس ارشد ایمونولوژی، مرکز تحقیقات ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی ایران، تهران، ایران
(III) استادیار، مرکز تحقیقات ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی ایران و مرکز تحقیقات نانوتکنولوژی، پژوهشکده فناوریهای نوین علوم پزشکی جهاد دانشگاهی ابن سینا، تهران، ایران
(IV) استاد، مرکز تحقیقات اعصاب بیمارستان امام خمینی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران، تهران، ایران
(V) دانشیار، مرکز تحقیقات اعصاب بیمارستان امام خمینی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران، تهران، ایران
(VI) دانشیار، مرکز تحقیقات عفونی بیمارستان حضرت رسول، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی ایران، تهران، ایران
(VII) کارشناس ارشد انگل شناسی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی ایران، تهران، ایران

غلاف میلینی فیبرهای عصبی از بین رفته و ضایعاتی در آکسون‌های قشر سفید مغز ایجاد می‌گردد. تعیین و شناسایی توالی رویدادهایی که منجر به تشکیل و توسعه پلاکهای التهابی در مغز می‌شود از اهداف اصلی تحقیقاتی در زمینه مولتیپل اسکلروز است. در مطالعات گذشته نظریه مربوط به نقش پاسخ‌های ایمنی $Th1$ در پاتوژنز بیماری MS قوت گرفته است.^(۲) همچنین مطابق تحقیقات انجام شده، تولید اینتراکتال ایمونوگلوبولینها در بیماران مبتلا به MS افزایش می‌یابد. مطالعات انجام شده پیشنهاد می‌کنند که آنتی ژنهای میلینی با این آنتی‌بادی‌ها واکنش می‌دهند.^(۳) در مطالعات اخیر در جهت شناسایی ویژگی IgG در نمونه‌های مایع مغزی-نخاعی بیماران مبتلا به MS دو اپیتوپ با اثربخشی زیاد مشتق از ویروس اپشتاین بار به عنوان مهم ترین اتوآنتی ژنها شناسایی شده است. در این بیماران واکنش ایمنی نسبت به آنتی ژنهای ویروسی EBNA-1 (Epstein-Barr Nuclear Antigen-1) و BRRF2 (از آنتی‌ژن‌های فاز نهفتگی) در سرم و مایع نخاع بیماران به طور قابل توجهی بیش از افراد کنترل بوده و IgG الیگوکلونال مایع نخاع در بیماران به طور اختصاصی به این دو اپیتوپ متصل می‌گردد. این یافته‌ها پیشنهاد می‌کند که این ویروس نقش مهمی در پاتوژنز بیماری ایفا می‌کند.^(۳) آنتی‌بادی‌های ضد ویروسی در افراد مبتلا در مقایسه با افراد کنترل بالاتر می‌باشد و نیز سطح افزایش یافته‌ای از آنتی‌بادی قبل از ظهور علائم کلینیکی بیماری وجود دارد. در مطالعات بعدی با اندازه‌گیری آنتی‌بادی IgG ضد آنتی‌ژنهای ویروسی VCA (Viral Capsid Antigen) و EBNA در نمونه‌های خون جمع آوری شده با متوسط زمان ۴ سال قبل از شروع بیماری، مشخص گردید که تیتراژ آنتی‌بادیها قبل از شروع بیماری بالا می‌باشد.^(۴) همچنین در مطالعه روی مایع نخاع بیماران مبتلا تیتراژ بالایی از آنتی‌بادی ضد EBNA-1 شناسایی شد و دو پپتید مشابه بین EBNA-1 و پروتئین بازی میلین (MBP) معرفی گردید.^(۵) افزایش میزان لنفوسیت‌های TCD8+ واکنش دهنده به دو اپیتوپ

ایمونودومیننت ویروس در بیماران مبتلا می‌تواند ناشی از واکنش متقاطع این اپیتوپ‌ها با میلین بازیک پروتئین باشد.^(۶) خطر ابتلا به مولتیپل اسکلروز بعد از عفونت مونوکلئوز عفونی به طور عمده‌ای افزایش می‌یابد و مولتیپل اسکلروز در بین افرادی که از نظر آنتی‌بادی ضد ویروس منفی هستند، نادر است.^(۷) این یافته‌ها افزایش پاسخ ایمنی به این ویروس را در بیماران نشان داده و نقش مهم این ویروس را در پاتوژنز بیماری پیشنهاد می‌کنند. همچنین در افرادی که بیماری در آنها گسترش می‌یابد یک پاسخ ایمنی تغییر یافته علیه ویروس با مشخصه افزایش IgG نسبت به EBNA-1 و فقدان واکنش به VCA ایجاد می‌شود. مطالعه روی نمونه‌های خون جمع آوری شده از ۵ سال قبل از شروع نوع عود یابنده/فروکش کننده (remitting/relapsing) بیماری نشان می‌دهد که افزایش واکنش نسبت به EBNA-1 با افزایش خطر ابتلا به بیماری و افزایش واکنش به VCA با کاهش خطر ابتلا بیماری همراه می‌باشد.^(۸) با توجه به نقش ویروس اپشتاین بار و سیستم ایمنی در اتیولوژی و پاتوژنز بیماری، هدف از این مطالعه بررسی ارتباط بین سطح سرمی آنتی‌بادی‌های ضد ویروس اپشتاین بار و تولید سایتوکاینهای IL-12، اینترفرون گاما، IL-4 توسط سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی بیماران مبتلا به MS جهت شناسایی روند پاسخ ایمنی به سمت $Th1$ یا $Th2$ می‌باشد.

روش بررسی

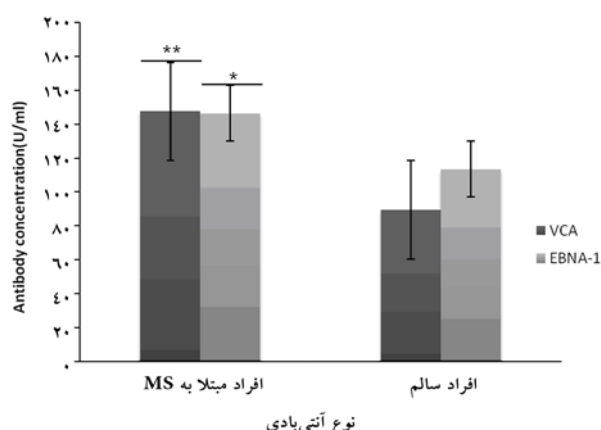
بیماران و نمونه‌ها: این مطالعه از نوع توصیفی می‌باشد. با مراجعه به بیمارستان امام خمینی، ۶۸ بیمار مبتلا به مولتیپل اسکلروز در مراحل مختلف بیماری که مبتلا به بیماری MS و مرحله بیماری توسط متخصصین مغز و اعصاب به تایید رسیده بود و ۲۰ نفر از افراد سالم فاقد بیماری به عنوان گروه کنترل انتخاب شدند. بعد از تنظیم فرم پرسشنامه، ۱۰ میلی لیتر خون هپارینه از بیماران و گروه کنترل گرفته شد. ۵ میلی لیتر آن در لوله‌های فالتون استریل

pg/ml برای IFN- γ , ۳۱/۲۵ pg/ml برای IL-12 و ۷/۸ pg/ml برای IL-4 می‌باشد.

آنالیز آماری: تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS (version 16) صورت گرفت. جهت مقایسه مقادیر سایتوکاینها آزمون آماری پارامتریک t-test و برای مقایسه مقادیر آنتی‌بادی‌های ضد EBV آزمون غیرپارامتریک Mann-Whitney بکار گرفته شد. همچنین برای بررسی ارتباط بین متغیرها از ضریب همبستگی پیرسون استفاده شد. $p < 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

تعداد کل افراد مورد بررسی در این تحقیق ۸۸ نفر بودند که به دو گروه بیماران مبتلا به مولتیپل اسکلروز (MS) به تعداد ۶۸ بیمار و افراد سالم به تعداد ۲۰ نفر تقسیم شدند. گروه بیماران (۴۹ زن و ۱۹ مرد) با میانگین سنی 34.5 ± 9.7 سال و افراد سالم (۱۰ زن و ۱۰ مرد) با میانگین سنی 27 ± 5 بودند. در هر دو گروه سطح سرمی آنتی‌بادیهای ضد EBNA-1 و VCA به روش الایزا بررسی شد. نتایج حاصله نشان داد که میانگین سطح آنتی‌بادی ضد EBNA-1 و VCA در افراد مبتلا به MS به طور معنی‌داری بیشتر از افراد سالم می‌باشد (به ترتیب $p=0.04$ و $p=0.01$) (نمودار شماره ۱).



نمودار شماره ۱- مقایسه میانگین سطح سرمی آنتی‌بادی‌های ضد EBNA-1 و VCA بر حسب واحد بر میلی لیتر (U/ml) در بیماران مبتلا به MS و گروه کنترل ($P < 0.01$, $***$; $P < 0.05$, $*$)

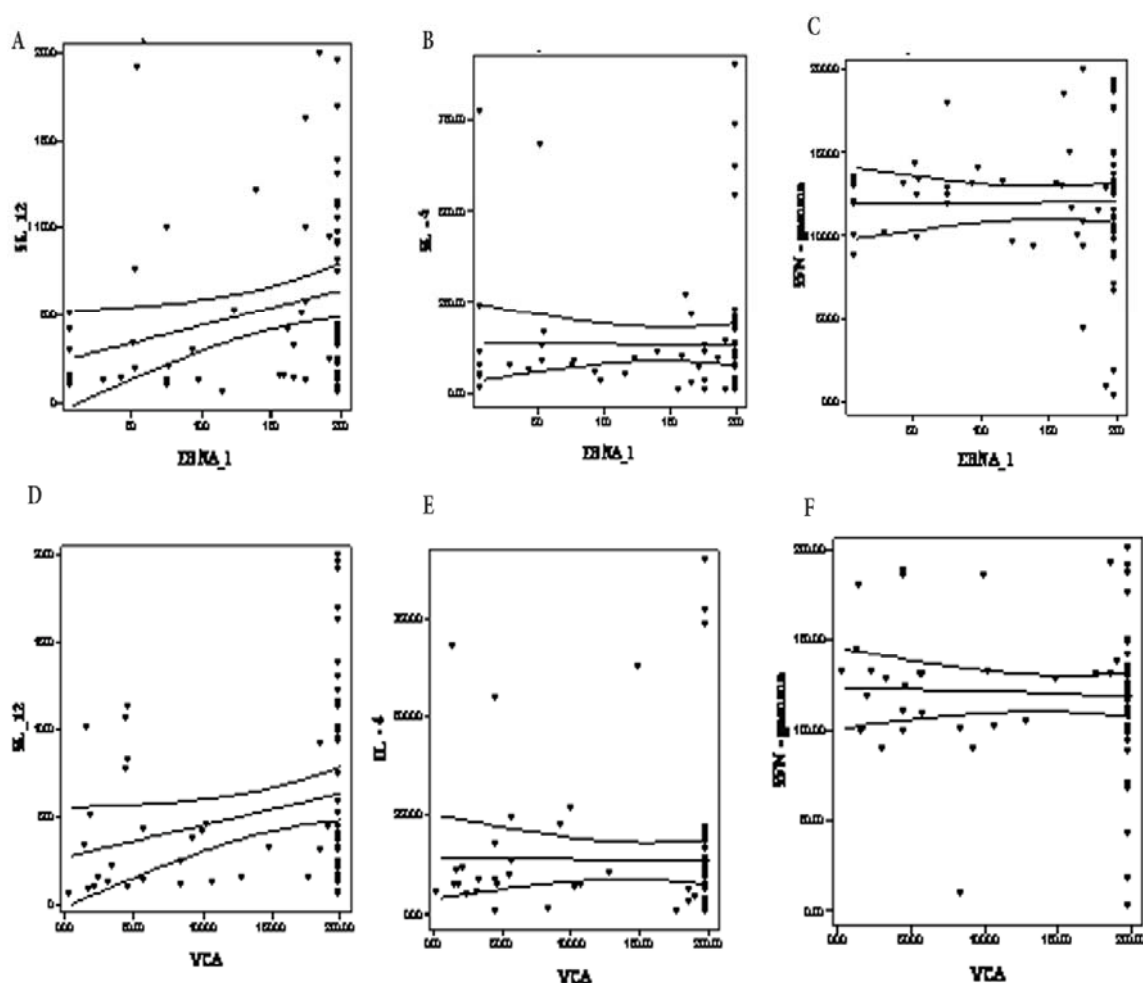
ریخته شد و پس از سانتریفوژ، پلاسمای خون جدا شده و به منظور اندازه‌گیری آنتی‌بادی‌های ضد EBNA-1 و VCA در فریزر -20°C نگهداری گردید. ۵ میلی لیتر باقیمانده جهت جداکردن سلول‌های تک هسته‌ای و کشت سلول مورد استفاده قرار گرفت.

جداکردن سلول‌های تک هسته‌ای و کشت سلول:

میلی لیتر باقیمانده خون به نسبت ۱:۲ با بافر فسفات (PBS) رقیق شد و پس از اضافه کردن برروی حجم مساوی از فایکول به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ (400g) شد. سلول‌های تک هسته‌ای از ناحیه حد فاصل جمع آوری و دوباره با PBS شسته شد. سپس این سلول‌ها با محیط کشت RPMI-1640 (Sigma /Germany) کامل حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاوی (Gibco/Germany) و آنتی‌بیوتیک‌های پنی سیلین، استرپتومایسین به حالت سوسپانسیون در آمده و با چگالی یک میلیون سلول در میلی لیتر در چاهک‌های پلیت ۲۴خانه (Grinner/Germany) کشت داده شدند. سپس به چاهک‌ها یک میکرولیتر حاوی ۵ میکروگرم فیتوهمالگوتینین (PHA-L) (Sigma /Germany) اضافه گردید. به چاهک کنترل منفی حجم مساوی از PBS اضافه شد. پس از کشت در انکوباتور 37°C ، ۵٪ CO_2 ، مایع رویی کشت سلولی در فواصل زمانی ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت جمع آوری و در فریزر -70°C نگهداری گردیدند.

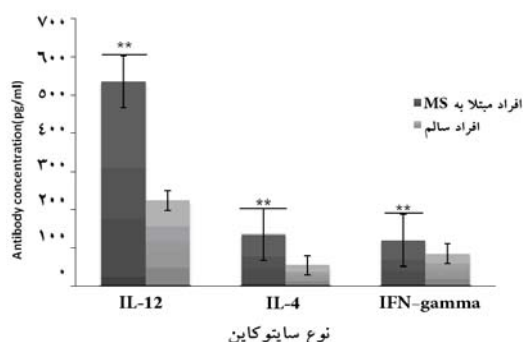
اندازه‌گیری سایتوکاین‌ها و آنتی‌بادی‌های ضد

ویروس اپشتاین بار به روش الیزا: غلظت آنتی‌بادیهای ضد EBNA-1 (Medac Diagnostika/Germany) و VCA (IBL/Germany) به روش الایزای غیر رقابتی طبق روش پیشنهادی شرکت سازنده تعیین گردید. حداقل حساسیت کیت‌های مورد استفاده برای EBNA-1، $9 < \text{U/ml}$ و برای VCA، $18 < \text{U/ml}$ می‌باشد. غلظت سایتوکاین‌های IFN- γ ، IL-12 و IL-4 نیز به روش الایزای غیر رقابتی با استفاده از کیت‌های تجاری کمپانی BenderMed بر اساس روش پیشنهادی شرکت سازنده تعیین شد. حداقل حساسیت کیت‌های مورد استفاده ۱/۵۶



شکل شماره ۱- نمودارهای scatter plot و ضریب همبستگی پیرسون مربوط به ارتباط سطح سرمی آنتی‌بادی‌های ضد EBNA-1 و VCA با سایتوکاینهای اینترلوکین ۱۲، اینترفرون گاما و اینترلوکین ۴، مطابق با یافته‌های این آزمون، بین غلظت آنتی‌بادی ضد EBNA-1 و VCA با تولید IL-12 ارتباط وجود دارد (نمودارهای A و D)؛ اما ارتباطی بین آنتی‌بادی ضد EBNA-1 و VCA با تولید IFN- γ و IL-4 وجود ندارد (نمودارهای B و E و F).

به منظور بررسی انحراف پاسخی ایمنی به سمت



نمودار شماره ۲- مقایسه میانگین مقادیر سایتوکاین‌های اینترلوکین ۱۲، اینترلوکین ۴، اینترفرون گاما، IL-4 و IFN- γ تولید شده توسط سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی تحریک شده با PHA بر حسب پیکوگرم بر میلی لیتر در بیماران مبتلا به MS و گروه کنترل

به منظور بررسی انحراف پاسخی ایمنی به سمت T_H1 یا T_H2 و همچنین ارتباط سایتوکاین‌ها با سطوح آنتی‌بادی‌های ضد EBNA-1 و VCA، سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی بیماران و گروه کنترل جدا و پس از تحریک با PHA، سطح سایتوکاین‌های IFN- γ ، IL-12 و IL-4 به روش الایزا در مایع رویی کشت سلول اندازه‌گیری شد. مطابق با آزمایشات اولیه، بیشترین تولید سایتوکاین‌های مذکور به ترتیب از روزهای ۳، ۲ و ۳ کشت بود. نتایج حاصله نشان داد که میزان تولید هر سه سایتوکاین توسط سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی در بیماران مبتلا به MS به طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل بیشتر است (به ترتیب

همچنین نسبت سایتوکاین‌های $IL-4/IFN-\gamma$ و $IL-4/IL-12$ در بیماران مبتلا به MS بیش از افراد سالم بود ولی این افزایش معنی‌دار نبود ($P>0.05$). بین افزایش غلظت آنتی‌بادی ضد EBNA-1 و VCA با تولید IL-12 ارتباط معنی‌داری وجود داشت (به ترتیب $P=0.02$ ، $r=0.27$ و $r=0.40$). در حالیکه ارتباطی میان افزایش سطح آنتی‌بادی‌های مذکور با تولید سایتوکاین‌های $IFN-\gamma$ و $IL-4$ در بیماران مشاهده نشد (شکل شماره ۱). در گروه کنترل نیز ارتباطی میان مقادیر سایتوکاین‌ها و آنتی‌بادی‌های ضد EBV دیده نشد.

بحث

این مطالعه اطلاعات بدست آمده از گزارشات قبلی در مورد مثبت بودن آنتی‌بادی‌های ضد اپشتاین بار ویروس در بیماران مبتلا به MS و حضور عفونت قبلی در این افراد را تایید می‌کند.^(۹) در این پژوهش میانگین سطح سرمی آنتی‌بادی‌های اختصاصی ضد EBNA-1 و VCA در افراد مبتلا به MS به طور معنی‌داری بیشتر از افراد سالم بود. نتایج مشابهی توسط Bray، Larsen و Wagner گزارش شد.^(۱۰، ۱۱) و Levin و همکارانش در سال ۲۰۰۳ سطح سرمی آنتی‌بادی‌های ضد EBNA-1 و VCA را در نمونه‌های ذخیره شده قبل از شروع بیماری سنجش کردند و نشان دادند که سطح سرمی آنتی‌بادی‌های مذکور قبل از شروع بیماری افزایش می‌یابد.^(۴) بنابراین بنظر می‌رسد که ویروس اپشتاین بار در پاتوژنز بیماری MS نقش مهمی ایفا می‌کند. بررسی غلظت IL-12، اینترفرون گاما و IL-4 مترشحه از سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی در بیماران مبتلا به MS نشان داد که غلظت سایتوکاین‌های مذکور به طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل بیشتر است. مطالعات اخیر (۱۲-۱۳) نیز نشان داده‌اند که میزان تولید IL-12، توسط سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی افراد مبتلا به MS به طور قابل توجهی افزایش می‌یابد.^(۱۲، ۱۳) و Onzeni و همکارانش نشان

دادند که حتی در غیاب افزایش سطح IL-12 افزایش بیان گیرنده این سایتوکاین می‌تواند در روند بیماری تاثیر گذار باشد.^(۱۴) افزایش سطح IL-12 در افراد مبتلا به MS می‌تواند به دلیل پاسخ ایمنی التهابی و فعال شدن فاگوسیت‌های التهابی ترشح کننده این سایتوکاین در بیماری MS باشد. IL-12 نقش مهمی در القای پاسخ‌های ایمنی سلولی دارد و افزایش آن نشاندهنده هدایت پاسخ ایمنی سلولی به سمت T_H1 و ایجاد التهاب می‌باشد. این سایتوکاین نقش اصلی را در تمایز لنفوسیت‌های T به زیر گروه T_H1 داشته و سبب افزایش تولید $IFN-\gamma$ از این سلول‌ها می‌گردد. $IFN-\gamma$ به نوبه خود در ایجاد پاسخ‌های التهابی نقش مهمی دارد. افزایش $IFN-\gamma$ در بیماران می‌تواند به دلیل پاسخ التهابی ایجاد شده در بیماری باشد. $IFN-\gamma$ به همراه IL-12 در تمایز سلول‌های T به سمت T_H1 نقش مهمی داشته و مطابق با یافته‌های این پژوهش افزایش این سایتوکاین‌ها نشان می‌دهد که بیماری MS یک بیماری التهابی بواسطه سلول‌های T_H1 است. علیرغم این، اگرچه نسبت سایتوکاین‌های $IL-4/IFN-\gamma$ و $IL-4/IL-12$ (که نشاندهنده نسبت پاسخ لنفوسیت‌های T_H1 به T_H2 می‌باشد) در بیماران مبتلا به MS بیش از افراد سالم بود ولی این افزایش معنی‌دار نبود.^(۷) Kipp و همکارانش نشان دادند که درصد سلول‌های T تولید کننده IL-4 در بیماران مبتلا به MS نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری دارد که با نتایج حاصل از این پژوهش همخوانی ندارد.^(۱۵) ولی بنظر می‌رسد که دلیل احتمالی افزایش IL-4 در بیماران مبتلا به MS می‌تواند مربوط به فعالیت سیستم ایمنی در تعدیل پاسخ‌ها به موازات افزایش فعالیت سلول‌های T_H1 باشد. همچنین احتمال دارد که افزایش IL-4 در تحریک لنفوسیت‌های B خود واکنشگر و تولید آنتی‌بادی ضد آنتی‌ژن‌های خودی نقش داشته باشد. نتایج بدست آمده در این مطالعه نشان داد بین افزایش غلظت آنتی‌بادی اختصاصی ضد EBNA-1 و VCA در بیماران مبتلا به MS با تولید IL-12 از سلول‌های تک هسته‌ای خون

نتیجه‌گیری

با توجه به ارتباط معنی‌دار بین افزایش سطح سرمی آنتی‌بادی‌های ضد ویروس اپشتاین بار با تولید سایتوکاین IL-12 در بیماران مبتلا به MS و نقش این سایتوکاین در هدایت پاسخ‌های ایمنی به سمت پاسخ‌های التهابی T_H1 ، یافته‌های این پژوهش نشان می‌دهند که ویروس اپشتاین بار می‌تواند نقش مهمی در پاتوژنز بیماری MS بازی کند.

تقدیر و تشکر

این تحقیق با استفاده از حمایت مالی معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی-درمانی ایران در قالب طرح تحقیقاتی انجام گردیده است که بدین وسیله نویسندگان مقاله، مراتب تقدیر و تشکر خود را از مسئولین آن معاونت ابراز می‌دارند.

محیطی ارتباط معنی‌داری وجود دارد. در حالیکه ارتباطی میان افزایش سطح آنتی‌بادی‌های مذکور با تولید سایتوکاین‌های $IFN-\gamma$ و IL-4 در بیماران مشاهده نشد. این ارتباط نشان می‌دهد که احتمالاً آلودگی به ویروس اپشتاین بار در بیماران مبتلا به MS می‌تواند سبب هدایت پاسخ ایمنی به سمت پاسخ‌های التهابی T_H1 گردد.

از محدودیت‌های پژوهش حاضر می‌توان به کافی نبودن تعداد بیماران مبتلا به MS در مراحل مختلف بیماری و عدم ارزیابی نتایج حاصله در هر گروه اشاره نمود. یافته‌های این پژوهش می‌تواند در شناسایی مکانیسم تخریب بافتی در سیستم اعصاب مرکزی جهت ایمونوتراپی و درمان هدفمند بیماران در آینده موثر واقع شود. همچنین ارزیابی اهمیت ویروس EBV در بروز یا تشدید بیماری که در صورت اثبات آن می‌توان درمان‌های آنتی‌ویرال را به همراه درمان‌های تعدیل‌کننده بکار برد.

فهرست منابع

- 1-Poser CM. The environment and the nervous system. *J Neurol Sci.* 2007(15); 262: 98-9
- 2-Frohman E.M, Racke M.K, Raine C.S. Multiple sclerosis-The Plaque and its pathogenesis. *N Engl J Med.* 2006; 354: 942-45
- 3-Reidl.M, Khalil.M, Berger.T. Antibodies as biological markers for pathophysiological processes in MS. *J Neuro immunol.* 2006; 180(1-2): 50-62
- 4-Levin L.I, Munger K.L, Rubertone M.V. Multiple sclerosis and Epstein-Barr virus *JAMA.* 2003; 289: 1533-36
- 5-Bray.P.F, Luka.J, Bray.P.F, Clup K.W, Schlight J.P. Antibodies against Epstein-Barr nuclear antigen (EBNA) in multiple sclerosis CSF and two pentapeptide sequence identities between EBNA and myelin basic protein. *Neurology.* 1992; 42: 1798-1804
- 6-Hollsberg P, Hansen H.J, Haahr.S. Altered CD8+ T cell responses to selected Epstein-Barr virus immunodominant epitopes in patients with multiple sclerosis *Clin.Exp. Immunol.* 2003; 132: 137-43
- 7-Holmoy T, Vartdal.F. Cerebrospinal fluid T cells from multiple sclerosis patients recognize autologous Epstein-Barr virus-transformed B cells. *J.Neurovirol.*

2004; 10: 52-6

- 8-Sundstrom P, Juto P, Wadell G, Hallmans G, Svenningsson A, Nystrom L, et al. An altered immune response to Epstein-Barr virus in multiple sclerosis: A prospective study *Neurology.* 2004; 62(12): 2277-82
- 9-Buljevac d van Doornum GJ, Flach HZ, Groen J, Osterhaus AD, Hop W, van Doorn PA, et al. Epstein-Barr virus and disease activity in multiple sclerosis *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2005; 76(10): 1377-81
- 10-Larsen P.D, Bloomer L.C, Bray P.F. Epstein-Barr nuclear antigen and viral capsid antigen antibody titers in multiple sclerosis. *Neurology.* 1985; 35:435-38
- 11-Wagner HJ, Hennig H, Jabs WJ, Siekhaus A, Wessel K, Wandinger Kp. Altered prevalence and reactivity of Epstein-Barr virus Antibodies in patients with multiple sclerosis. *viral immunol.* 2000; 13(4): 497-502
- 12-Makhlouf K, Weiner HL, Khoury S.J. Increased percentage of IL-12+ Monocytes in the blood correlates with the presence of active MRI lesions in MS. *J Neuro Immunol.* 2001; 119(1): 145-49
- 13-Van Boxel-Dezaire AH, Hoff SC, Oosten BW, Verweij CL, Drager AM, Van Houwelingen JC, et

al. Decreased Interleukin (IL)-10 and increased IL-12 p40 mRNA are associated with disease Activity and characterize different disease stages in multiple sclerosis, *Ann Neurol.* 1999; 45: 695-703

14-Onzenci V, Pashenkov M, Kouwenhoven M, Rinaldi L, Soderstrom M, Link H. IL-12/IL-12R System in

multiple sclerosis, *J Neuro Immunol.* 2001; 114: 242-52

15-Kipp B, Bar-Or A, Gausling R, Oliveira E.M, Fruhan S.A, Stuart W.H. et al. A novel population of B7-1+ T cells Producing intracellular IL-4 is decreased in patients with multipleSclerosis. *Eur. J. Immunol.* 2000; 30: 2092-100

Evaluation of Serum Levels of Anti-Epstein Barr Virus Antibodies and Production of IFN- γ , IL-4 and IL-12 by Mitogen-activated Peripheral Blood Mononuclear Cells in Patients with Multiple Sclerosis

* M.Shekarabi, PhD^I
M.Ghaffarpour, MD^{IV}

B.Laribi, MSc^{II}
M.Ghabaee, MD^V
M.Bakhshayesh, MSc^{VII}

A.H.Zarnani, PhD^{III}
S.Nourbakhsh, MD^{VI}

Abstract

Background & Aim: Multiple sclerosis (MS) is the most common inflammatory disease of central nervous system which is caused by an autoimmune process leading to destruction of myelin sheath. In this disease, CD4+ T-lymphocytes, mostly of TH1 phenotype, play important roles in destruction of neuronal tissues. Because of the probable etiologic participation of EBV virus in immunopathogenesis of MS, the aim of this study was to evaluate the relationship between serum levels of anti-Epstein Barr virus antibodies and production of TH1 and TH2 cytokines.

Patients and Method: A descriptive study was performed on 68 MS patients in different stages of the disease and 20 healthy individuals. Blood samples were taken and plasma levels of anti-EBNA-1 and VCA antibodies were determined by ELISA method. Then, peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated by Ficoll Hipaque separation and stimulated with PHA in optimal culture conditions. Concentrations of IFN- γ , IL-12 and IL-4 in culture supernatants were then measured by ELISA. Statistical analysis was performed by using SPSS version 16. Mann-Whitney, t-test, and Pearson correlation coefficient were used to compare the variables and find the correlation between them. $P < 0.005$ was considered statistically significant.

Results: The mean levels of anti EBNA-1 and VCA antibodies were significantly higher in patients compared to controls ($P = 0.04$, $P = 0.001$ respectively). Concentrations of IFN- γ , IL-4 and IL-12 were also significantly higher in MS patients than healthy individuals ($P = 0.001$, $P = 0.005$, $p = 0.002$ respectively). Although the ratios of IFN- γ to IL-4 and IL-12 to IL-4 were higher in MS patients than healthy individuals, this increase did not reach a significant level ($P > 0.05$). A statistically significant correlation was found between anti EBNA-1 and VCA antibodies and IL-12 production ($P = 0.02$, $r = 0.27$ & $P = 0.04$, $r = 0.25$ respectively) whereas no significant correlation was found between these antibodies and production of IFN- γ and IL-4 in MS patients.

Conclusion: The significant correlation between the level of anti-Epstein Barr virus antibodies and IL-12 production in MS patients implies the probable role of this cytokine in skewing immune responses toward TH1 phenotype. It is possible that this putative viral agent in combination with other etiological agents is involved in the etiology and progression of the disease.

Key Words: 1) Epstein Barr Virus 2) Multiple Sclerosis 3) Cytokine

This article is an abstract of Ms.Laribi's thesis advised by Dr.Shekarabi and read by Dr.Zarnani in partial fulfillment of an MS degree in immunology.

*I) Associate Professor of Immunology. Research Center of Immunology. Iran University of Medical Sciences and Health Services. Tehran, Iran. (*Corresponding Author)*

II) MSc in Immunology. Research Center of Immunology. Iran University of Medical Sciences and Health Services. Tehran, Iran.

III) Assistant Professor of Immunology, Research Center of Immunology, Iran University of Medical Sciences & Reproductive Biotechnology Research Center Avicenna Research Institute, Tehran, Iran.

IV) Professor of Neurology, Center of Neurological Research, Imam Khomeini Hospital, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

V) Associate professor of Neurology, Center of Neurological Research, Imam Khomeini Hospital, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

VI) Associate Professor, Hazrate Rasoul Hospital Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

VII) Ms.c of Parasitology, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.